



**Instituto de Biología y Genética Molecular. Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular y Fisiología**

Universidad de Valladolid – CSIC

**“Estudio de la función de Apolipoproteína D en la interacción
microglía – astrogliá ante el estrés oxidativo y la inflamación”**

Trabajo de Fin de Máster en Investigación Biomédica

SONIA SANZ MUÑOZ

Directores: Diego Sánchez y María Dolores Ganfornina

Julio 2012

Índice

1. Introducción.....	3
Apolipoproteína D.....	3
Apolipoproteína D en el sistema nervioso	6
Microglía.....	7
2. Objetivos	9
3. Materiales y métodos	10
Animales	10
Cultivos celulares.....	10
Obtención de cultivos enriquecidos en microglía.....	10
Caracterización del cultivo de microglía	11
Análisis de la activación microglial ante estrés oxidativo.....	11
Análisis de la activación microglial ante la inflamación	11
Inmunocitoquímica	12
Inmunoblot.....	13
RT-qPCR	14
Análisis estadístico	15
4. Resultados	16
Aislamiento de microglía en cultivo primario y caracterización del cultivo.....	16
Estudio de la activación glial ante un estímulo pro-oxidativo.....	19
Estudio de la activación glial ante un estímulo proinflamatorio.	21
5. Discusión y perspectivas	23
Caracterización de los cultivos enriquecidos en microglía	23
Respuestas gliales a estímulos pro-oxidantes y proinflamatorios.....	24
Respuesta a la oxidación.....	24
Respuesta a la inflamación.....	25
6. Bibliografía	27

1. Introducción

Apolipoproteína D

La apolipoproteína D (ApoD) es una glicoproteína de la familia de las lipocalinas que se expresa tanto durante el desarrollo normal como durante el envejecimiento. Fue detectada por primera vez en el plasma (Ayrault-Jarrier et al. 1963) asociada a lipoproteínas de alta densidad (HDL), de donde fue aislada por McConathy y Alaupovic (1973).

Inicialmente se consideró que ApoD pertenecía al grupo de las apolipoproteínas por su localización en las HDL, pero tanto el estudio de su estructura primaria (Drayna et al. 1986) como el de su distribución en los tejidos (revisado por Rassart et al. 2000) no mostró homología con esta familia, pero sí con las lipocalinas. Las lipocalinas son una familia de pequeñas proteínas globulares y extracelulares de 150-250 aminoácidos que comparten propiedades moleculares de reconocimiento, como la unión de moléculas pequeñas e hidrofóbicas, la unión a receptores específicos de superficie y la formación de complejos covalentes y no covalentes con otras macromoléculas solubles. Así, se vio que ApoD tenía hasta un 25% de identidad con proteínas que unen retinol (RBP) y un 30-40% con proteínas de insecto que unen bilina (BBP) (Rassart et al. 2000). En un principio se consideró a las lipocalinas como proteínas de transporte y almacenaje de vitaminas, hormonas y otros metabolitos secundarios, pero ahora se ha visto que está implicada en otros procesos como la regulación del metabolismo y de la respuesta inmune, la respuesta al estrés, la guía de axones, etc.

El gen de ApoD se encuentra localizado en humanos dentro de la región p14.2 en el cromosoma 3 y en ratón en el cromosoma 16. Su cDNA fue clonado por primera vez en 1986 (Drayna et al. 1986), y en humanos este gen tiene 855 bp divididos en 5 exones con una distribución característica de la familia de las lipocalinas en cordados (Sanchez et al. 2006a). El gen de ApoD muestra una región promotora que abarca 10 kbp por delante del primer exón, y estudios en esta región muestran la presencia de muchos elementos reguladores (Lambert et al. 1993; Levros et al. 2010).

La estructura primaria de ApoD es una cadena compuesta por 189 aminoácidos que le confieren un peso molecular de 18,1 kDa. Dependiendo del tejido en el que sea sintetizada tiene un patrón de glicosilaciones diferente, variando su peso entre los 19 y los 32 kDa fundamentalmente por las glicosilaciones en los residuos de asparagina en las posiciones 45 y 178. En su secuencia aminoacídica se encuentra un péptido señal formado por 20 aminoácidos, que será cortado después del procesado dejando una proteína de 169 aminoácidos. Las 5 cisteínas de su secuencia forman puentes disulfuro dos a dos para mantener la estructura, y la quinta se unirá con otras macromoléculas biológicas del plasma (Rassart et al. 2000). Esta quinta cisteína desapareada es una peculiaridad de ApoD humana que no se encuentra en el resto de los organismos conocidos, incluyendo el ratón.

Las apolipoproteínas tienen una estructura secundaria en α -hélice, pero ApoD no sigue este patrón, sino que su estructura está formada fundamentalmente por láminas β . Su estructura, característica de la familia de las lipocalinas, consta de 8 láminas β antiparalelas flanqueadas por una hélice α y conectadas entre sí por 7 lazos. Los puentes disulfuro de sus cisteínas ayudan finalmente a mantener la estructura de barril β ligeramente distendido (Eichinger et al. 2007).

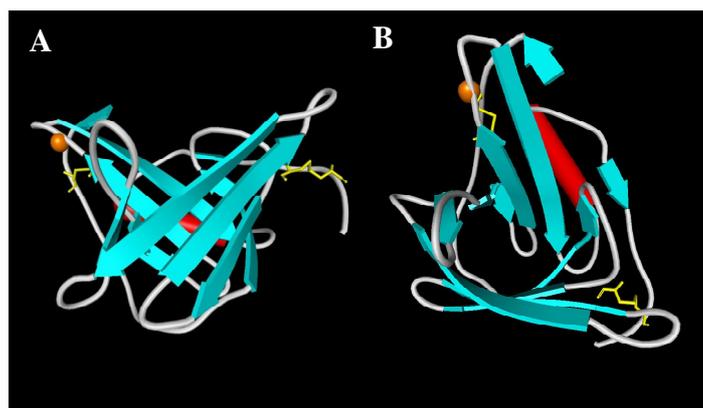


Figura 1. Estructura tridimensional de ApoD humana. Se observa su estructura en barril β formando un bolsillo y su hélice α . Se han destacado los puentes disulfuro entre las cisteínas 41-165 y 8-114 (en amarillo) y la cisteína 116 desapareada (C α en naranja).

Las particularidades de esta estructura confieren a ApoD unas características muy importantes para predecir su funcionalidad:

- Pequeños ligandos hidrofóbicos se unen al bolsillo formado en el interior del barril.
- Los aminoácidos hidrofóbicos de su superficie podrían permitir el anclaje de la proteína a la fase lipídica de las membranas o a otras moléculas hidrofóbicas.
- La cisteína 116 de ApoD humana, que no se une con otras cisteínas de su estructura, sí lo hace con otras moléculas que contengan residuos de cisteína y posibilita la formación de dímeros de la propia proteína.

Estas características y la amplia distribución de ApoD en mamíferos nos hacen intuir su importancia, proponiéndose desde hace tiempo como una proteína multifuncional. Es posible que los ligandos asociados con esta proteína varíen dependiendo de las condiciones del tejido o del órgano en que se encuentre, pudiendo ser una proteína de fase aguda en la regeneración nerviosa, servir para evacuar moléculas tóxicas generadas en el bazo en la destrucción de los eritrocitos, o ayudar al transporte de esteroides en órganos como las glándulas adrenales o los testículos (Rassart et al. 2000). También se piensa que ApoD puede no sólo tener una función local, sino también actuar de forma paracrina mediante la circulación, ayudando en la distribución de sus ligandos a tejidos diferentes de aquellos donde se expresa (Provost et al. 1990).

Mientras que las apolipoproteínas se expresan fundamentalmente en el hígado y el intestino, la síntesis de ApoD en humano se localiza en el páncreas, la placenta, el bazo, los pulmones, los ovarios, los testículos, el cerebro, los nervios periféricos, los riñones y las glándulas adrenales (Rassart et al. 2000). ApoD también se encuentra en secreciones apocrinas axilares donde muestra un patrón de glicosilación diferente al encontrado en plasma y en otros fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo, el fluido lacrimal, la perilinfa y los fluidos del oído interno.

En otros mamíferos, como mono y conejo, se encuentra igualmente una amplia distribución de ApoD en los tejidos corporales (Provost et al. 1990; Smith et al. 1990); pero en rata y ratón la distribución es mucho más estrecha, estando prácticamente limitada al sistema nervioso central,

donde se encuentra en la médula espinal, cerebro y cerebelo. A pesar de estas diferencias, la similitud de sus regiones codificantes indica una misma función transportadora de ligandos (Cofer and Ross 1996; Seguin et al. 1995).

A nivel celular, el mRNA de ApoD es expresado principalmente por fibroblastos, y más específicamente por fibroblastos que están próximos a los vasos sanguíneos. Dentro del sistema nervioso central, su expresión se observa en células gliales de la sustancia blanca, fundamentalmente astrocitos y oligodendrocitos, mientras que en el sistema nervioso periférico se expresa en células de Schwann (Rassart et al. 2000).

Tras haberse comprobado que, a pesar de su nombre, ApoD no se engloba dentro del grupo de las apolipoproteínas, la reconstrucción filogenética de las lipocalinas de metazoos tanto en función de su estructura génica como de su secuencia de aminoácidos coloca a ApoD en la base del árbol filogenético, más cercana a las lipocalinas de otros reinos (plantas, hongos, protoctistas y procariotas) y perteneciente al mismo clado que las lipocalinas de invertebrados (Ganfornina et al. 2006). Lazarillo (Laz) es una lipocalina de artrópodos encontrada en embriones de saltamontes *Schistocerca americana*, donde se vio su participación en el crecimiento y la guía de axones durante el desarrollo embrionario (Sanchez et al. 1995), habiendo sido ApoD descrita como su ortólogo en vertebrados (Ganfornina et al. 1995). En *Drosophila melanogaster* se encuentran dos genes homólogos de Lazarillo, llamados Lazarillo Glial (GLaz) y Lazarillo Neural (NLaz) debido a su expresión en células gliales y neuronas respectivamente (Sanchez et al. 2000). Con estos datos podemos encuadrar a ApoD como la sucesora de una de las lipocalinas ancestrales que se encuentran presentes en los primeros cordados.

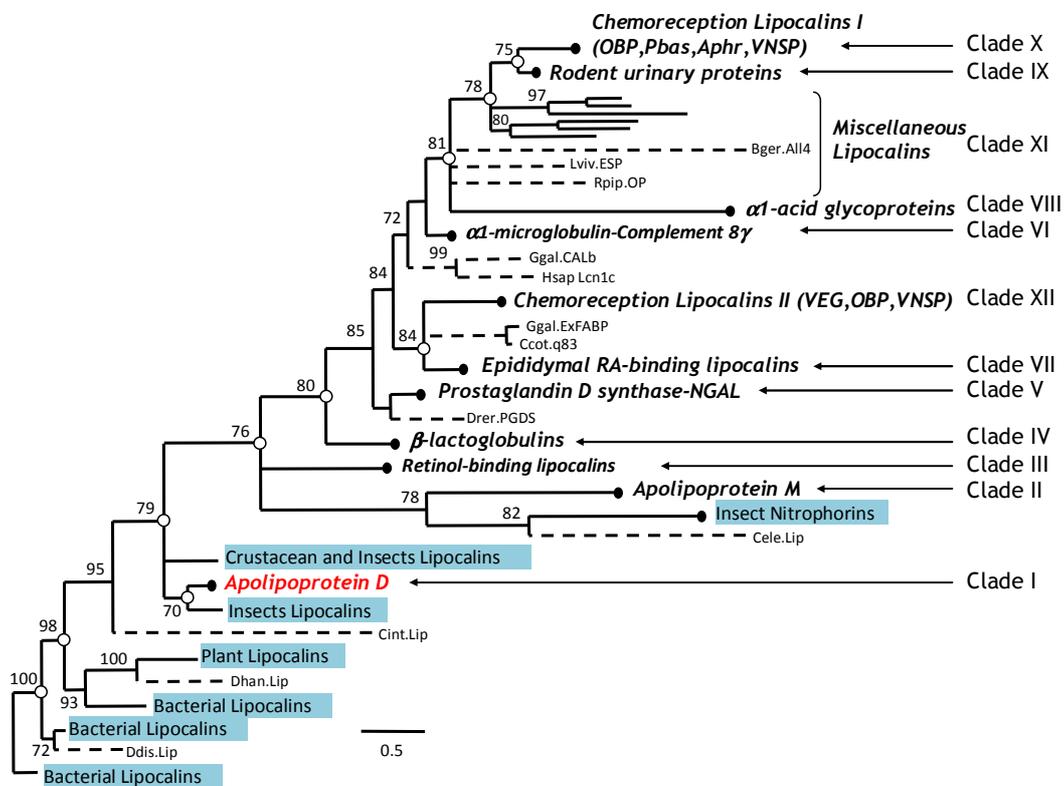


Figura 2. Filogenia molecular de las proteínas de la familia de las Lipocalinas.

Apolipoproteína D en el sistema nervioso

Uno de los lugares de máxima expresión de ApoD es el sistema nervioso de los mamíferos estudiados hasta el momento, sintetizándose tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, donde la proteína es sintetizada por determinados tipos celulares y posiblemente captada por otros. En otros tejidos la función de ApoD podría variar dependiendo del lugar de secreción, pero en el sistema nervioso parece estar bastante clara su implicación en procesos de reparación y remielinización tras situaciones traumáticas.

En el sistema nervioso periférico ApoD es sintetizada fundamentalmente por fibroblastos y células de Schwann, donde se pensaba que podría contribuir al mantenimiento, homeostasis y movimiento de lípidos en los nervios periféricos (Boyles et al. 1990). La presencia de ApoD se ve aumentada en el nervio periférico de rata tras una lesión (Spreyer et al. 1990), y su falta muestra, incluso en nervios sanos, una disminución en la velocidad de la conductividad motora y vainas de mielina más delgadas. Ante un daño se ha demostrado que ApoD ayuda a recuperar la función locomotora promoviendo la limpieza de mielina y regulando el número de macrófagos en la zona dañada, estando así implicada en la señalización de procesos inflamatorios (Ganfornina et al. 2010).

En el sistema nervioso central ApoD está expresada por astrocitos, oligodendrocitos, células precursoras de oligodendrocitos, algunas neuronas y células piales y perivasculares (Ganfornina et al. 2005; Navarro et al. 2004; Navarro et al. 1998; Sanchez et al. 2002).

El incremento de ApoD en el sistema nervioso no ocurre solamente ante un daño, sino que se ha visto también durante el desarrollo y el envejecimiento, en el cual la inflamación es uno de los procesos fundamentales que ocurren (Navarro et al. 2010), y no se limita sólo a humanos, habiéndose comprobado igualmente tanto en monos como en ratones (Loerch et al. 2008).

Un incremento anormal de ApoD ha sido encontrado en el fluido cerebroespinal e hipocampo (Terrisse et al. 1998) y en el córtex prefrontal (Thomas et al. 2003) en pacientes con la enfermedad de Alzheimer. En la enfermedad de Parkinson, caracterizada por una degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, especialmente vulnerables al estrés oxidativo, hay un incremento en la expresión de ApoD en las células gliales (Ordoñez et al. 2006). Igualmente, en otras enfermedades neurodegenerativas se encuentran elevados niveles de expresión de ApoD respecto a pacientes sanos, como es el caso de esquizofrenia, trastorno bipolar (Thomas et al. 2001), Niemann-Pick tipo C (Suresh et al. 1998) o esclerosis múltiple (Reindl et al. 2001).

Poniendo en conjunto la correlación directa de ApoD ante envejecimiento y enfermedad, la pregunta a responder sería si es la causa del daño o la respuesta protectora que intenta frenarlo.

Los estudios realizados en mutantes de *Drosophila melanogaster* deficientes en GLaz (Sanchez et al. 2006a) y NLaz (Hull-Thompson et al. 2009), homólogos de ApoD, revelan un elevado número de células apoptóticas así como elevados niveles de peroxidación lipídica y una esperanza de vida corta cuando se compara con el genotipo silvestre. Por otro lado, se utilizó el ratón como animal modelo para mostrar el papel que tiene ApoD en relación con el estrés oxidativo, un fenómeno biológico que se incrementa con el envejecimiento. El Paraquat, un generador de estrés oxidativo, se utilizó en ratones deficientes en ApoD produciendo una mayor peroxidación lipídica que en animales silvestres. Por el contrario, sobreexpresando ApoD en el

cerebro ante este estímulo se consigue una disminución de dicha peroxidación lipídica (Ganfornina et al. 2008).

Un análisis realizado en cerebelo adulto en respuesta al estrés oxidativo demuestra que procesos biológicos como son el mantenimiento de la mielina y la respuesta glial al estrés son funciones directamente dependientes de ApoD, necesaria en condiciones normales y más aún ante daño (Bajo-Grañeras et al. 2011a). Siendo ApoD expresada por astrocitos, su adición a cultivos de astrocitos deficientes en esta proteína mejora su viabilidad cuando se exponen a estrés oxidativo, lo que indica que ApoD media una protección autocrina que contribuye a la homeostasis del sistema nervioso ante el estrés oxidativo (Bajo-Grañeras et al. 2011b).

Toda esta información revela que ApoD tiene un mecanismo neuroprotector, que se pone en marcha ante el estrés oxidativo y la inflamación a fin de evitar el efecto dañino que ambos procesos tienen sobre las células.

Microglía

La microglía fue descrita por primera vez por Pío del Río Hortega en 1932 (Del Río-Hortega 1932) siendo, junto con astrocitos y oligodendrocitos, la tercera población de células gliales en el sistema nervioso central. Su amplia distribución a lo largo del cerebro y médula espinal además de su origen a partir del linaje fagocítico mononuclear la sitúa como la clave inmunológica que actúa como sensor ante condiciones patológicas.

Morfológicamente podemos diferenciar a la microglía en dos estados:

- Microglía “en reposo”: Se encuentra en el cerebro adulto en condiciones normales, teniendo una morfología ramificada, con un soma estático y procesos con alta motilidad. Esta motilidad está relacionada con su función para explorar el microambiente en busca de cambios patológicos o estímulos inflamatorios. Varios estudios recientes relacionan a la microglía con otras funciones como monitorizar la sinapsis (Wake et al. 2009), controlar la sinaptogénesis (Roumier et al. 2004) o inducir apoptosis en células de Purkinje (Marin-Teva et al. 2004).
- Microglía activada: Se encuentra tanto durante el desarrollo embrionario temprano como ante estados de activación, adquiriendo una morfología ameboide. El grado de activación de la microglía depende de la extensión y la intensidad del estímulo, pudiéndose observar un gradiente de activación microglial en regiones del cerebro desde el epicentro de una lesión hacia la periferia, siendo este estado reversible una vez el estímulo haya cesado (Streit 2000). Una infección, un trauma, una isquemia, una patología neurodegenerativa, la alteración de la actividad neuronal o cualquier perturbación o pérdida de la homeostasis cerebral indica un daño real o potencial del sistema nervioso central, provocando la activación microglial. Además de su cambio morfológico, la activación microglial consiste también en un cambio en su comportamiento funcional y su expresión génica. Algunas poblaciones microgliales comienzan a proliferar para proporcionar una mayor defensa, se induce una reordenación de sus moléculas de superficie cambiando sus interacciones célula-célula y célula-matriz, hay cambios en las enzimas intracelulares y, por último, liberan múltiples factores con efectos proinflamatorios e inmunoreguladores (Kettenmann et al. 2011). La activación microglial es uno de los principales eventos en los procesos de

neuroinflamación aguda y es esencial para la cicatrización de heridas en el sistema nervioso central (Streit and Xue 2009).

Entre los múltiples factores proinflamatorios que son liberados por la microglía durante su activación, las citoquinas constituyen una porción significativa de los mensajeros inmuno y neuromoduladores. Por medio de estas citoquinas la microglía mantiene el bienestar del sistema nervioso y responde a cualquier tipo de señales que impliquen un cambio en la homeostasis del medio con el fin de activar mecanismos de defensa innata o ayudar en caso de reacciones inmunes específicas.

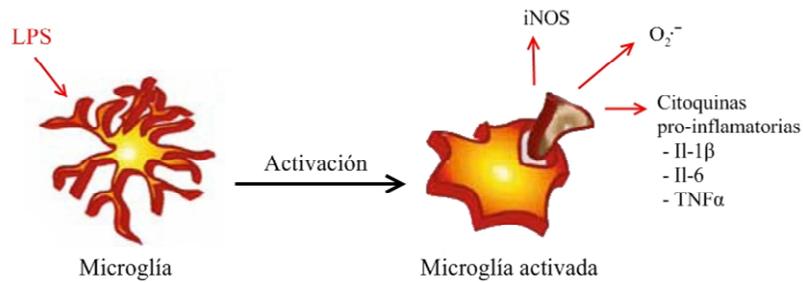


Figura 3. Activación de la microglía.

La microglía y los astrocitos son los responsables de muchos desórdenes neurológicos asociados con el estrés oxidativo y la neuroinflamación. Ha sido ampliamente estudiado el impacto que tienen las células gliales en la supervivencia neuronal, pero son menos los estudios sobre la interacción entre la astrogliya y la microglía durante este proceso.

Una serie de trabajos recientes ponen de manifiesto la influencia que tiene la interacción microglía-astrogliya ante estímulos proinflamatorios y oxidativos, demostrando que la resistencia que ofrecen los astrocitos frente al estrés oxidativo se ve incrementada en presencia de microglía y es significativamente mayor cuanto mayor sea el grado de activación microglial (Armbrust and Rohl 2008; Röhl et al. 2010; Röhl et al. 2008).

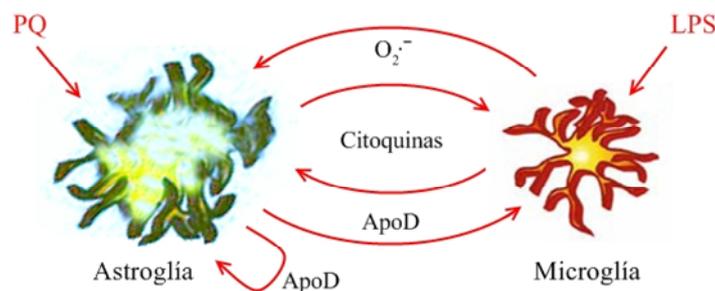


Figura 4. Intercambio de señales astrogliya-microglía ante su activación.

2. Objetivos

Como se ha expuesto en la introducción de este trabajo, ApoD se sintetiza fundamentalmente en el sistema nervioso, no sólo en humanos, sino también en animales modelo como el ratón, donde se están haciendo los principales estudios. Nuestra hipótesis actual es que ApoD tiene la capacidad de actuar como protector frente al estrés oxidativo, por un lado regulando la respuesta glial ante el estrés oxidativo y por otro como un señalizador en el proceso de inflamación. Asumimos que ApoD es secretada por astrocitos y oligodendrocitos en el sistema nervioso central, pero poco se sabe acerca de cómo influye ApoD sobre la microglía o cómo puede variar su respuesta en ausencia de ApoD.

Las premisas e hipótesis de partida de este trabajo son las siguientes:

- ApoD es expresada por astrocitos y oligodendrocitos y no por microglía, su expresión se eleva en situaciones degenerativas y patológicas del sistema nervioso como mecanismo de defensa ante el daño.
- ApoD interviene regulando la respuesta astroglía-microglía.
- Los astrocitos se activan ante un estímulo oxidativo liberando factores al medio (entre ellos ApoD) que, en condiciones normales, activan a la microglía.
- La microglía se activa directamente ante estímulos proinflamatorios.

El OBJETIVO GENERAL de mi proyecto consiste en estudiar cómo interviene ApoD en las señales moleculares que se originan en la interacción entre las células gliales ante diferentes estímulos inflamatorios y generadores de estrés oxidativo. Este objetivo lo estudiaré inicialmente a nivel celular en cultivos primarios utilizando como modelo experimental ratones silvestres (WT) y ratones de función nula de ApoD (ApoD-knockout, ApoD-KO).

Como OBJETIVOS ESPECÍFICOS me he propuesto:

- La puesta a punto y caracterización de cultivos gliales primarios enriquecidos en microglía.
- El estudio de la activación microglial ante un estímulo generador de estrés oxidativo.
 - ¿El estímulo pro-oxidante activa directamente a la microglía o es sólo mediado por los factores astrocitarios?
 - Si existe activación directa, ¿estará modulada por la presencia de ApoD?
- Estudio de la activación de la microglía ante un estímulo proinflamatorio.
 - ¿Esta respuesta es mediada por los astrocitos? ¿Y por ApoD?

3. Materiales y métodos

Animales

Para la realización de este estudio se han utilizado ratones de la cepa C57BL/6J de dos genotipos distintos: ratones silvestres (WT) y mutantes de pérdida de función (knock-out) para ApoD (ApoD-KO).

Los ratones se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y luz, a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, siendo alimentados con una dieta estándar para roedores (Global Diet 2014: Harlan) y agua *ad libitum*.

Cultivos celulares

Para los cultivos mixtos de astrocitos y microglía primarios de corteza de ratón se usaron ratones neonatos (P0 – P1). Las cortezas cerebrales fueron extraídas rápidamente, eliminando las meninges por rodamiento sobre un papel de filtro estéril y manteniéndose en medio EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) con albúmina de suero bovino (BSA) 0,2 mg/ml y DNasa I 2,4 mg/ml. El tejido fue cortado en pequeños trozos con bisturí quirúrgico, centrifugado (200g, 2 min) e incubado con tripsina 10mg/ml, DNasa I 2,4 mg/ml y BSA 0,2 mg/ml en medio EBSS durante 15 min a 37°C . La reacción fue parada por adición de 10% FBS y disgregada mecánicamente con una pipeta Pasteur. Tras una centrifugación (200g, 5 min) las células obtenidas fueron resuspendidas en Dubelcco's Modified Eagle's medium F12 (DMEM:F12) con 10% FBS y 1% P/S/A (Penicilina 10U/ μl , Estreptomicina 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y Anfotericina B 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sembradas en placas de cultivo de plástico estéril de 9,6 cm^2 (Nunc, Thermo Fisher Scientific) e incubadas a 37°C con 5% CO_2 y 90-95% de humedad. El medio fue cambiado a las 24 horas y posteriormente cada 5-7 días.

Obtención de cultivos enriquecidos en microglía

Transcurridos 10-12 días *in vitro* (DIV) el cultivo llega a confluencia, pero se mantiene hasta 20 DIV. Durante este tiempo tiene lugar una mayor proliferación de microglía.

A los 19 DIV se hace un cambio de medio y a las 24 horas se retira este medio condicionado, conservándolo a 37°C tras una centrifugación (1000 g, 5 min) para eliminar cualquier resto celular. El cultivo es lavado con PBS para eliminar cualquier resto de suero e incubado en tripsina 500 mg/l durante 30 min a 37°C . Con esto se consigue que los astrocitos se despeguen de la placa y que la microglía, que se encuentra por debajo de la monocapa de astrocitos, se mantenga pegada a la placa de cultivo. Se para la reacción con la misma cantidad de medio DMEM:F12 10% FBS, se recoge la suspensión celular y se centrifuga (300 g, 5 min). La placa que contiene la microglía adherida es lavada con PBS para eliminar cualquier resto de tripsina que haya podido quedar y se añade el medio condicionado previamente obtenido. Este medio condicionado con los factores producidos por el cultivo mixto sirve para mantener nuestro cultivo enriquecido en microglía. Las células centrifugadas constituyen una mezcla de astrocitos y microglía, que llamaremos cultivo mixto, y se resiembran en una placa de cultivo estéril con medio DMEM:F12.

Ambos cultivos se mantienen en incubación a 37°C con 5% CO_2 y 90-95% de humedad hasta ser usados a las 24 horas.

Caracterización del cultivo de microglía

Con el fin de caracterizar el cultivo enriquecido en microglía se realizó la detección de diversos marcadores mediante inmunocitoquímica, inmunoblot (Western blot) y PCR cuantitativa (RT-qPCR).

La inmunocitoquímica se realizó para detectar un marcador astrogliar, GFAP, y tres microgliales, Cd11b, F4/80 y Galectina 3.

El inmunoblot se realizó para cuantificar la expresión de ApoD y de los marcadores microgliales Galectina 3, Cd11b e iNOS.

La RT-qPCR se realizó para cuantificar la expresión del marcador microglial F4/80.

Análisis de la activación microglial ante estrés oxidativo

Para simular un proceso de estrés oxidativo se expuso el cultivo celular a 24 horas de Paraquat (PQ).

El experimento fue diseñado según muestra la figura 5, añadiendo PQ 500 μ M a los cultivos experimentales.

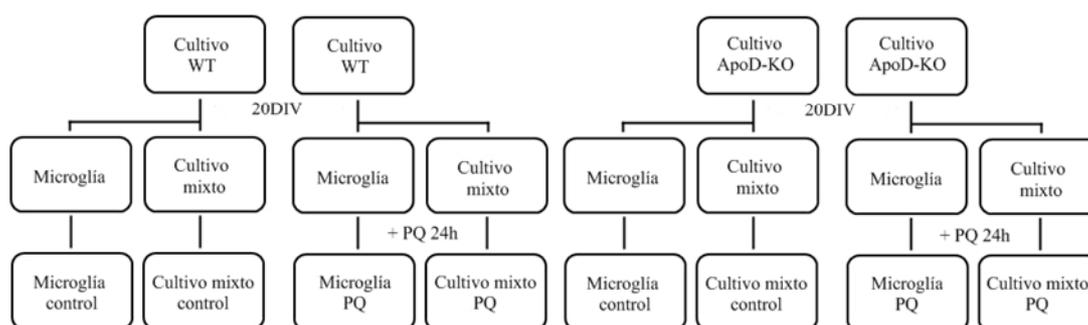


Figura 5. Diseño del experimento de exposición a PQ 24h.

A las 24 horas se produjo la recogida de las células con Trizol® (Invitrogen) tanto para la purificación de RNA y la cuantificación de Il-1 β y ApoD mediante RT-qPCR como para la posterior extracción de proteínas y la cuantificación de ApoD y Galectina 3 mediante inmunoblot.

Análisis de la activación microglial ante la inflamación

Para simular un proceso de inflamación se expuso el cultivo celular a lipopolisacárido bacteriano (LPS) durante 24 horas.

Seis horas después de la obtención del cultivo enriquecido en microglía y de la obtención del cultivo mixto se produjo la adición de 10 mg/ml de LPS según muestra el diseño del experimento de la figura 6.

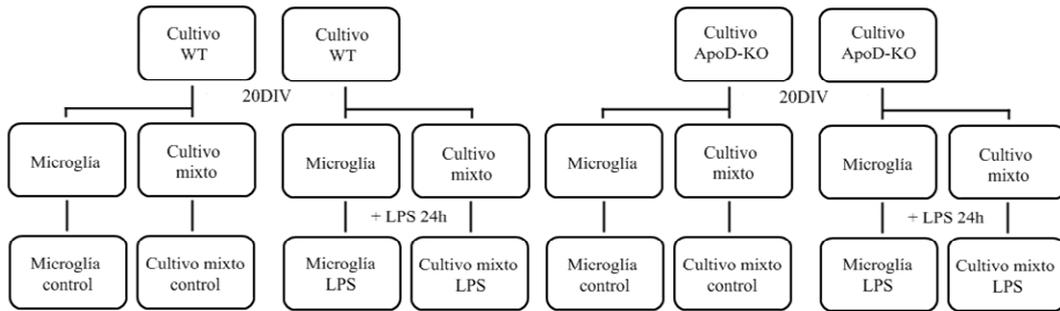


Figura 6. Diseño del experimento de exposición a LPS 24 horas.

A las 24 horas de cultivo se produjo la recogida de las células con Qiazol® (Qiagen). La utilización en este caso de Qiazol® en vez de con Trizol® fue debido a los mejores resultados obtenidos por los miembros del laboratorio tras algunos problemas en el momento de la purificación del RNA al utilizar Trizol®. De este extracto se purificó el RNA para la obtención cDNA y posterior cuantificación de TNF α , Il-1 β y ApoD por RT-qPCR.

Inmunocitoquímica

La caracterización de los cultivos de microglía se realizó inicialmente por inmunocitoquímica.

La microglía se levantó de las placas de cultivo a las 24 horas de su aislamiento por adición de tripsina e incubación a 37°C, parando la reacción a los 5-10 minutos con la misma cantidad de medio DMEM:F12 10% FBS. Con ayuda de un rascador se despegaron las células y, tras una centrifugación (300 g 5 min), se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de medio. Debido a la poca densidad celular obtenida en los cultivos, la siembra se realizó en cristales de 1,13cm² tratados con poly-L-lisina a muy baja concentración celular (aprox. 200cél/mm²).

La fijación de las células se llevó a cabo con formaldehído 4% durante 15 min a temperatura ambiente después de haber realizado 3 lavados con PBS de 10 min cada uno, con cuidado de que no se despegasen las células. Transcurrido el tiempo de fijación se realizaron otros 3 lavados de 10 minutos con PBS para eliminar cualquier resto del fijador.

En los experimentos de inmunocitoquímica en los que el anticuerpo secundario está conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), el primer paso es la inactivación de la peroxidasa endógena de las células, para lo cual se realizó un lavado de 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con PBS – 0,9% H₂O₂ seguido de 2 lavados de 5 min con PBS. El proceso continúa para todos los experimentos de inmunocitoquímicas con un bloqueo realizado con PBS - 0,1% Tween-20 con 1% suero de cabra durante 30 min. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en solución PBS – 0,1% Tween-20 e incubados a temperatura ambiente. Transcurrida 1 hora se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se procedió a la incubación del anticuerpo secundario en PBS – 0,1% Tween-20 durante 30 min a temperatura ambiente.

En los experimentos de inmunocitoquímica con anticuerpo secundario conjugado con HRP el revelado del color se realizó añadiendo una solución de 5 ml Tris 0,05M con DAB 0,03% y H₂O₂ 0,0018%, controlando la reacción bajo lupa para pararla en el momento que las células adquirieran un color marrón, momento en el que se retiró la solución de revelado y se añadió

PBS. El montaje de las muestras se realizó con glicerol y agua en concentración 1:1 sellándolas con laca de uñas.

En el caso de los experimentos de inmunocitoquímica en los que el anticuerpo secundario va unido a un fluorocromo se hizo una doble inmunocitoquímica secuencial: tras la primera inmunocitoquímica, antes de montar, se realizó en los mismos cristales otra inmunocitoquímica dirigida a otro antígeno. Como en este caso no era necesario revelado porque son observadas al microscopio de fluorescencia, se montaron directamente con Vectashield-DAPI diluido 1:10 en dH₂O y sellado con laca de uñas.

La observación de las células se realizó en un microscopio Nikon Eclipse 80i equipado con una Cámara Digital DMX 1200c.

Tabla 1. Lista de anticuerpos utilizados.

Anticuerpos primarios	Anticuerpos secundarios
- Ratón monoclonal α GFAP (1:200) (Santa Cruz)	- Cabra α ratón HRP (1:200) - Cabra α ratón Alexa 594 (1:5000)
- Rata α Galectina 3 (Mac-2) (1:1000)	- Cabra α rata HRP (1:200) - Cabra α rata FITC (1:5000)
- Rata α Cd11b (1:100) (M1/70.15.11.5.2)	- Cabra α rata HRP (1:200)
- Rata monoclonal α mouse F4/80 (1:1000) (Abcam)	- Cabra α rata HRP (1:200)

Inmunoblot

Las proteínas se extrajeron de la fase orgánica del Trizol® o Qiazol®. Para ello, se siguió el protocolo del proveedor, quedando finalmente en una solución de Urea/DTT (10M urea, 50mM DTT en dH₂O).

Las proteínas fueron separadas en función de su peso molecular mediante una electroforesis vertical de proteínas en geles de poliacrilamida al 7,5 ó 12%. Se polimerizaron monómeros de acrilamida/bisacrilamida 37,5:1 utilizando como catalizadores persulfato de amonio (APS) al 10% y TEMED (N,N,N',N'-Tetrametildiamina). Las electroforesis se realizaron bajo condiciones desnaturizantes con 0,1% dodecilsulfato sódico (SDS) según el método de Laemmli (SDS-PAGE). Los extractos proteicos se prepararon añadiendo un tampón de carga (Tris-HCl 63 mM, Glicerol 10%, SDS 2%, DTT 10mM) y se desnaturizaron durante 5 minutos a 100°C. Las electroforesis se realizaron en una cubeta con una solución amortiguadora (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% dH₂O) a un voltaje de 80V durante 30 min y posteriormente elevado a 100V hasta el final del experimento.

Tras la separación de las proteínas por SDS-PAGE, éstas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF a un amperaje constante de 400mA durante 90 minutos en un tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% y pH 8,5). Al finalizar la transferencia, la membrana fue bloqueada durante 12 horas a 4°C (con 5% leche o 3% BSA + 0,05% Tween-20 en solución tamponada con Tris, TBS). El anticuerpo primario se añadió diluido en la solución de bloqueo y la incubación se realizó durante 12 horas a 4°C. Tras 3

lavados de 10 min con TBS – 0,05% Tween-20 la membrana se incubó durante 2 horas con el anticuerpo secundario conjugado con HRP diluido en TBS – 0,05% Tween-20. Tras los 3 últimos lavados, todas las membranas se incubaron durante una hora con el anticuerpo Ratón monoclonal α β -actina HRP (1:200, Sigma), usado para su posterior cuantificación como control de carga. Finalmente se procedió a revelar la señal quimioluminiscente con una solución de ECL (Millipore) usando el sistema de captura de imagen VersaDoc™ (BioRad).

Tabla 2. Lista de anticuerpos utilizados para inmunoblot.

% gel	Bloqueo	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
12%	Leche 5%	- Cabra α ratón ApoD (1:500) (Santa Cruz)	- Burro α cabra (1:10000)
12%	Leche 5%	- Rata α Galectina 3 (1:200)	- Cabra α rata HRP (1:10000)
7,5%	Leche 5%	- Cabra policlonal α Cd11b (1:200) (Santa Cruz)	- Burro α cabra HRP (1:10000)
7,5%	BSA 3%	- Conejo policlonal α NOS2 (1:200) (Santa Cruz)	- Cabra α conejo HRP (1:10000)

RT-qPCR

Tanto para caracterizar los cultivos de microglía como para cuantificar la expresión de diferentes genes en microglía WT y ApoD-KO se utilizó la metodología de RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR).

El RNA de las células fue recogido por adición directa de Trizol® o Qiazol® en el cultivo y siguiendo el protocolo del proveedor. En el último paso el RNA fue resuspendido en dH₂O en función de la cantidad de células de partida. Para comprobar la concentración de RNA obtenida, las muestras fueron medidas espectrofotométricamente en un equipo Nanodrop y posteriormente separadas en un gel de agarosa al 1% para evaluar la integridad del RNA.

Antes de hacer la reacción de retrotranscripción (RT) se hizo un tratamiento con DNAsa para eliminar la posible contaminación por DNA genómico. Se utilizaron 500ng de RNA con 1 U/ μ l DNAsa from RNAqueous kit (Ambion) en un volumen total de 10 μ l. La reacción se produjo a 37°C durante 15 min y fue parada subiendo la temperatura a 90° durante 5 min.

Para la retrotranscripción se utilizó el kit PrimeScript™ RT reagent kit (Takara), utilizando como cebadores una mezcla de oligo dT (50 μ M) y hexámeros aleatorios (100 μ M) en un volumen final de 10 μ l, añadidos directamente sobre los 10 μ l de muestra tratada con DNAsa. La reacción fue llevada a cabo durante 1 hora a 42°C.

Antes de realizar la RT-qPCR, para asegurar que la RT había ocurrido satisfactoriamente, se hizo una PCR convencional del gen Rpl18, que codifica para una proteína ribosomal. Como molde se usó una dilución 1:10 del cDNA obtenido, los cebadores para MrPL18 (MrPL18-F y MrPL18-R) a una concentración 10 μ M y GOTaq mix 2x de Promega. El programa utilizado fue: 94°C 2 min (94°C 30 seg, 58°C 30 seg, 72°C 45 seg) x 35 ciclos y 72°C 5 min. Las muestras fueron separadas en gel de agarosa al 1% para comprobar la correcta amplificación del fragmento esperado.

Tanto el tratamiento con DNAsa como la retrotranscripción y la PCR convencional se llevaron a cabo en el equipo MJ Mini Personal Thermal Cycler de BioRad.

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo utilizando SYBR Green® mix (Takara) y utilizando como gen de referencia L18.

Tabla 3. Lista de cebadores utilizados para la RT-qPCR.

Gen diana	Nombre cebador	Secuencia
RpL18	MrPL18-F	5'- TTCCGTCTTTCCGGACCT -3'
	MrPL18-R	5'- TCGGCTCATGAACAACCTCT -3'
F4/80	Emr1-F	5'- AAGCAGTGCAGGGCAGGGAT -3'
	Emr1-R	5'- GCAAGATGGTGCCCAGAGTGGA -3'
ApoD	mApoD-EAK-F	5'- GAAGCCAAACAGAGCAACG -3'
	mApoD-PET-R	5'- TGTTTCTGGAGGGAGATAAGGA -3'
TNF α	Tnfa-F	5'- TCTTCTCATTCTGCTTGTGGCAG -3'
	Tnfa-R	5'- TGGTTTGCTACGACGTGGGCT -3'
Il-1 β	Il-1 β -F	5'- TGTAATGAAAGACGGCACACCCAC -3'
	Il-1 β -R	5'- GGCTTGTGCTCTGCTTGTGAGG -3'

El programa utilizado para los transcritos de Emr1, ApoD y TNF α fue: 95°C 30 seg, (95°C 5 seg, 58°C 15 seg, 72°C 15 seg) x 35 ciclos, seguido de una curva de desnaturalización desde 65°C a 95°C en etapas de 0,5°C.

El programa utilizado para el transcrito de Il-1 β fue: 95°C 30 seg (95°C 5 seg, 55°C 15 seg, 72°C 15 seg) x 35 ciclos, seguido de una curva de desnaturalización desde 65°C a 95°C en etapas de 0,5°C.

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un termociclador RotorGene (Corvette). Finalmente, se cuantificó la cantidad relativa de cada transcrito mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen and Livak, 2008).

Análisis estadístico

El análisis estadístico en los experimentos de RT-qPCR se realizó con el programa SigmaPlot v11.0 usando el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney con un nivel de significación $p < 0,05$ (*).

4. Resultados

Aislamiento de microglía en cultivo primario y caracterización del cultivo.

El primer objetivo de este trabajo consistió en aislar la población microglial de un cultivo primario de corteza cerebral de ratones neonatos y caracterizarlo para ver la pureza del cultivo resultante.

El protocolo seguido para el aislamiento de microglía fue el método de tripsinización empleado por Saura et al. (2003) por ser sencillo y con medios que se encontraban ya disponibles en el laboratorio.

Para determinar la pureza del cultivo enriquecido en microglía de manera cualitativa se utilizaron técnicas inmunocitoquímicas.

El primer experimento consistió en hacer una doble detección de los marcadores GFAP y Galectina 3 por inmunofluorescencia.

- GFAP es la proteína predominante en los filamentos intermedios del citoesqueleto astrocitario. Se conoce por ser un marcador clásico de astrocitos y por estar inducido ante un daño cerebral o cuando hay degeneración del sistema nervioso central (Middeldorp and Hol 2011).
- Galectina 3, previamente llamado MAC-2, pertenece a la familia de las β -galactosidasas que unen lectinas. Se expresa en diferentes tipos celulares entre ellos la microglía, donde parece ser fundamental en la fagocitosis, puesto que su expresión aumenta en microglía activada (Rotshenker et al. 2008).

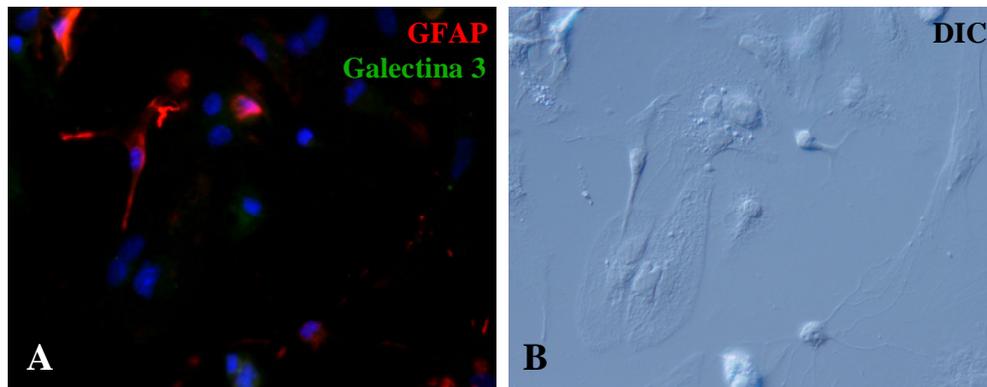


Figura 7. Expresión de Galectina 3 y GFAP en cultivos mixtos obtenidos de ratón WT. A) Imagen tomada por inmunofluorescencia. B) Imagen tomada por Nomarski.

Con esta aproximación experimental se encontraron bastantes células sin marcar, como se puede observar al comparar ambas imágenes de la figura 7, puesto que ambos anticuerpos iban dirigidos contra antígenos expresados mayoritariamente en situación de activación tanto microglial como astroglial. Además, el marcaje de Galectina 3 no es muy intenso, lo que dificulta su observación.

Las siguientes inmunocitoquímicas se diseñaron empleando un revelado con DAB para obtener un marcaje más claro y permanente. Para esto experimentos, además de GFAP y Galectina 3 empleados anteriormente, se usaron también los marcadores Cd11b y F4/80.

- CD11b forma, junto con CD18, el receptor del complemento tipo 3 (Mac 1), implicado en procesos de fagocitosis y opsonización. Su expresión también se ve incrementada en la activación microglial.
- F4/80 es un receptor de membrana perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteínas G. F4/80 es expresado por un subconjunto de células macrofágicas, entre las que se encuentra la microglía, pudiendo estar implicado en la inducción de la tolerancia inmunológica (van den Berg and Kraal 2005), sin ser dependiente de activación.

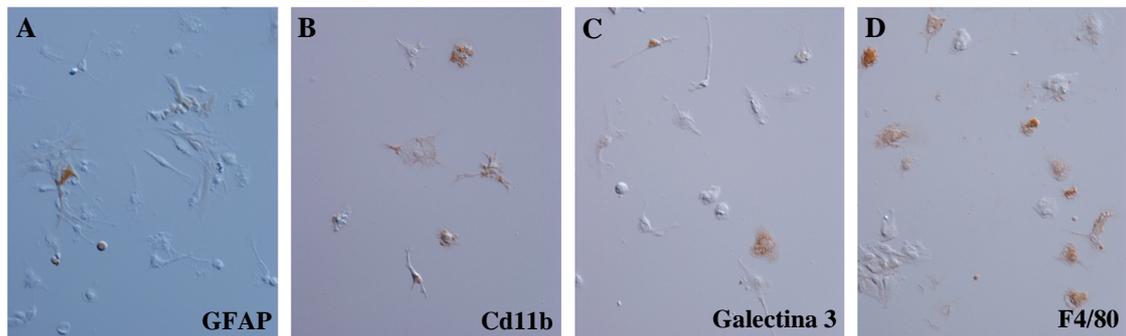


Figura 8. Expresión representativa de GFAP, Cd11b, Galectina 3 y F4/80 en cultivos enriquecidos en microglía obtenido de ratones WT.

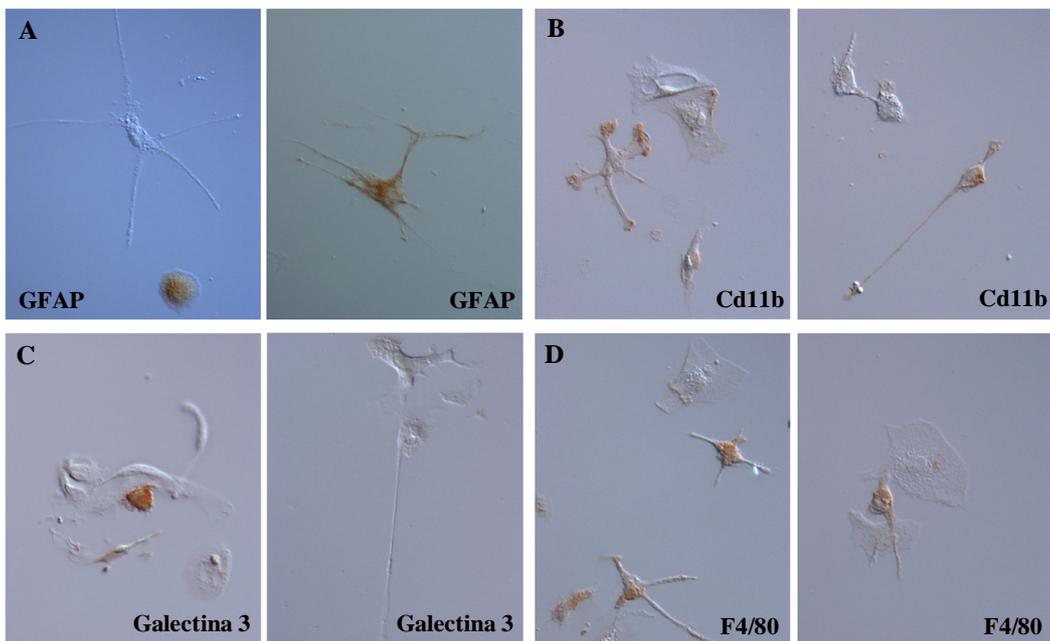


Figura 9. Tipos celulares marcados con GFAP, Cd11b, Galectina 3 y F4/80 en cultivos enriquecidos en microglía obtenidos en ratones WT.

El marcaje obtenido fue mejor, pero debido a la poca densidad celular obtenida en los cultivos no se pudo considerar un método adecuado para realizar conteos y obtener resultados

significativos, de tanto por ciento de enriquecimiento. De todas formas fue muy adecuado para estudiar las características de cada marcador.

Un enriquecimiento relativo se puede observar en la figura 8, siendo más característico el obtenido con los marcadores GFAP (Fig. 8A), Cd11b (Fig. 8B) y F4/80 (Fig. 8D), mientras que en Galectina 3 (Fig. 8C) encontramos menos células marcadas a pesar de ser un marcador microglial. En la figura 9 se observa más en detalle estos marcajes, comprobando cómo Galectina 3 (Fig. 9C) es un marcador característico de microglía ameboide activada pero no de microglía ramificada en reposo, mientras que la expresión de los demás marcadores se observa en cualquiera de los dos estados.

Se comprobó la expresión de Cd11b y Galectina 3 por inmunoblot para poder evaluar su expresión cuantitativamente. Además se usaron anticuerpos para reconocer ApoD e iNOS con el fin de probar si ambos anticuerpos podrían ser utilizados en los siguientes experimentos.

- La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) es una oxidoreductasa responsable de la síntesis de óxido nítrico, que se encuentra en elevados niveles en el sistema nervioso central asociado a patologías como neuroinflamación o enfermedades neurodegenerativas. Basalmente, la microglía no expresa iNOS, pero ante ciertos estímulos, ésta se activa y aumenta su expresión (Saha and Pahan 2006).

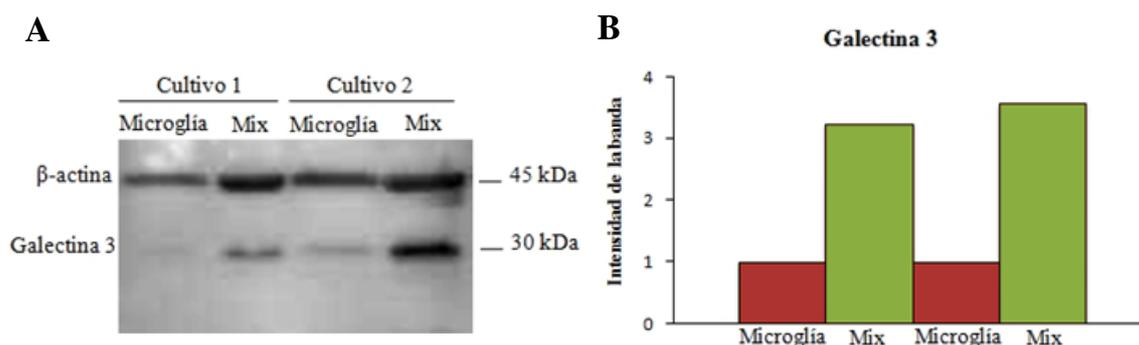


Figura 10. Expresión de Galectina 3 cuantificada por inmunoblot en cultivos mixtos y enriquecidos en microglía. A) Expresión de Galectina 3 en inmunoblot. B) Cuantificación de expresión de Galectina 3.

Salvo para Galectina 3 los resultados obtenidos mediante esta técnica no fueron los deseados. Se obtuvo en varias ocasiones un fondo elevado con la poca expresión de las proteínas a evaluar. Esto hizo imposible la visualización de una banda nítida tanto para ApoD como para Cd11b. En el caso de iNOS la banda obtenida no correspondía con el peso molecular de la proteína esperada. Galectina 3 fue la única proteína cuya expresión pude determinar con claridad, y aunque debido a su alto grado de expresión en los cultivos mixtos no sirve como forma de cuantificar la pureza de los cultivos enriquecidos en microglía, sí nos vuelve a dar información sobre las características de este marcador. En la figura 9C observábamos que se expresaba solamente en microglía activada, siendo esto apoyado con que su expresión esté aumentada cuando la microglía se encuentra en contacto con los astrocitos, los cuales regulan su activación.

Finalmente, como técnica cuantitativa, se decidió usar RT-qPCR para cuantificar la expresión de F4/80, uno de los marcadores microgliales menos dependiente del estado de activación de las células como se observa en la figura 9A, obteniendo un incremento de hasta

nueve veces en los cultivos enriquecidos en microglía respecto a los cultivos mixtos, como se observa en la figura 11.

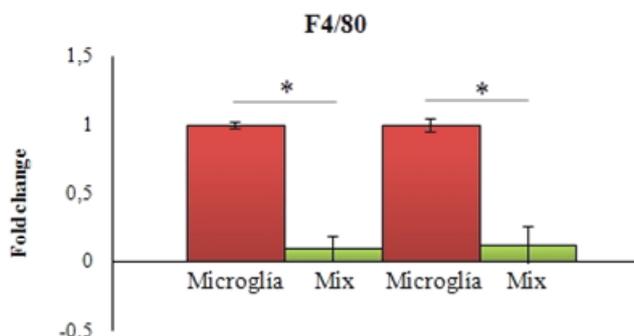


Figura 11. Expresión del gen F4/80 en cultivos mixtos y enriquecidos en microglía.

Estudio de la activación glial ante un estímulo pro-oxidativo.

El Paraquat (PQ) fue el tratamiento elegido como generador de estrés oxidativo en cultivo por ser un compuesto cuya utilización está estandarizada en el laboratorio para este fin. La concentración utilizada fue 500 μ M, añadidos directamente tras la tripsinización y mantenido durante 24 horas en incubación. La diferencia morfológica del cultivo tratado respecto del control se puede observar en la figura 12, viendo una morfología ramificada típica de reposo en los controles y activada ameboide en los tratados.

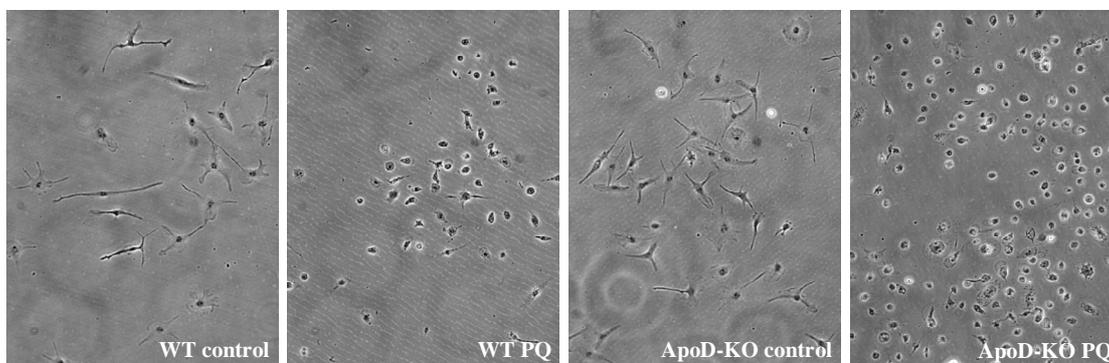


Figura 12. Morfología celular de los cultivos enriquecidos en microglía WT y ApoD-KO en situación control y tras tratamiento con PQ 24h.

En estos experimentos cuantifiqué la expresión de Galectina 3 y de ApoD por inmunoblot. En el caso de ApoD la visualización se hizo difícil debido al elevado fondo (Fig. 13A), pero a pesar de ello se pudo observar un incremento en el cultivo mixto experimental respecto al control (Fig. 13B). En Galectina 3 se observa un claro incremento de expresión en los cultivos mixtos con respecto a los enriquecidos en microglía como se observó en la figura 10B. Respecto a la condición experimental, en el cultivo enriquecido en microglía se observa una leve disminución, probablemente no significativa, pero se encuentra más aumentada en el cultivo mixto. En ambos casos, los experimentos han de ser replicados para poder evaluar estadísticamente la significación de los cambios.

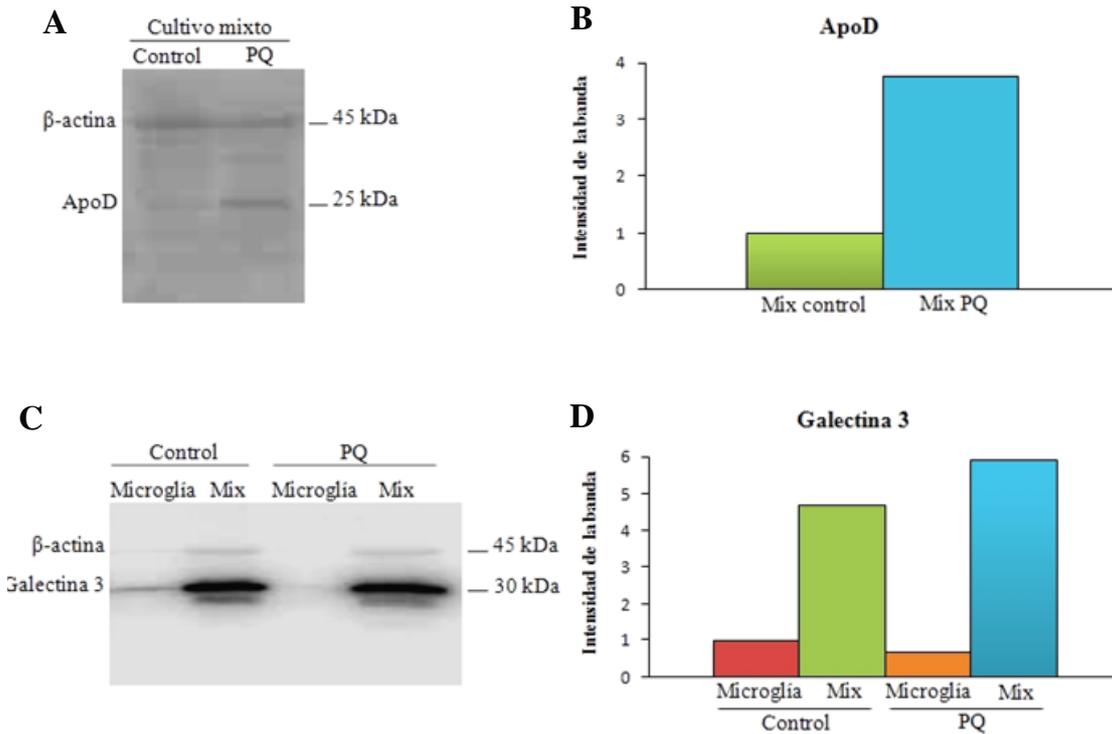


Figura 13. Expresión y cuantificación de las proteínas ApoD y Galectina 3 por inmunoblot. A) Expresión de ApoD en cultivos mixtos WT en situación control y tras tratamiento con PQ 24h. B) Cuantificación de la expresión de ApoD. C) Expresión de Galectina 3 en cultivo WT mixto y enriquecido en microglía en situación control y tras tratamiento con PQ 24h. D) Cuantificación de la expresión de Galectina 3.

Uno de los problemas técnicos en relación a los cultivos de microglía fue que la cantidad de muestra obtenida era pequeña (como puede observarse por la banda de β -actina, usada como control de carga en la figura 13C). Por lo tanto se recurrió de nuevo a la RT-qPCR por ser una técnica mucho más sensible. Se realizó una cuantificación de la expresión de Il-1 β , citoquina proinflamatoria secretada por la microglía activada. Los resultados muestran una activación basal en los ratones ApoD-KO, pero esta activación está disminuida tanto en ratones silvestres como ApoD-KO a las 24 horas de tratamiento con PQ.

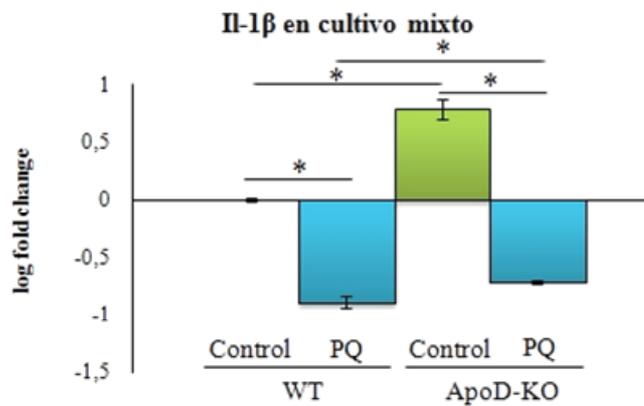


Figura 14. Expresión de Il-1 β en cultivos mixtos WT y ApoD-KO en condiciones control y tras 24h de tratamiento con PQ.

Igualmente, se analizó por RT-qPCR la expresión de ApoD en los cultivos mixtos para caracterizarlos, sin encontrar ninguna variación a las 24 horas de exposición al estrés oxidativo.

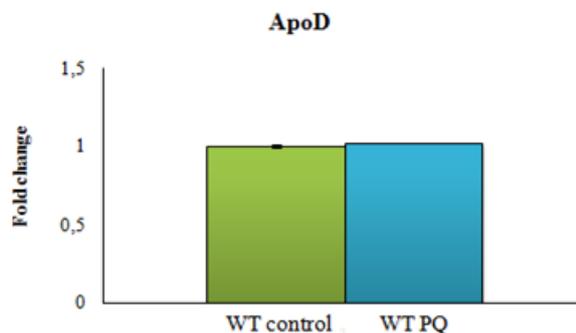


Figura 15. Expresión de ApoD en cultivos mixtos WT en condiciones control y experimentales.

Estudio de la activación glial ante un estímulo proinflamatorio.

La técnica empleada para simular un estímulo proinflamatorio fue el lipopolisacárido bacteriano (LPS), un potente estimulante inmunológico que causa un amplio espectro de respuestas proinflamatorias en microglía (Weinstein et al. 2008). Empleando una concentración de 10 mg/ml a las 6 horas post-tripsinización y tras una incubación de los cultivos durante 24 horas tienen el aspecto mostrado en la figura 16, no encontrando diferencia morfológica entre el cultivo control y el experimental.

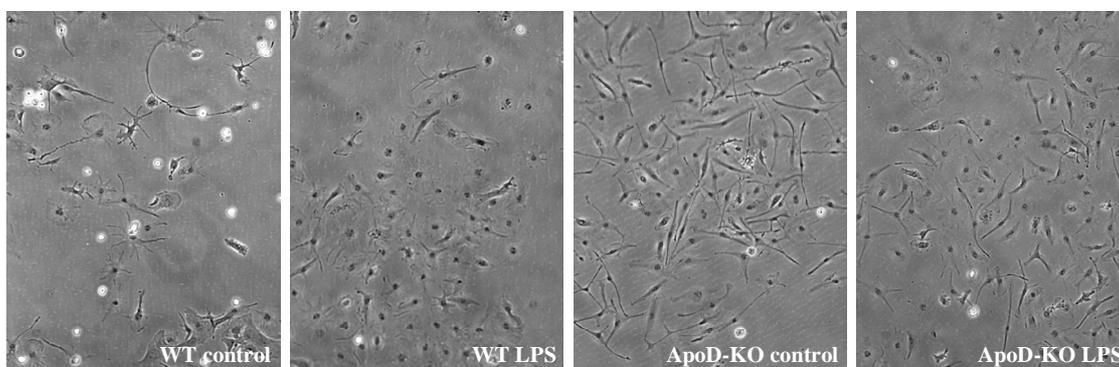


Figura 16. Morfología celular del cultivo WT y ApoD-KO en situación control y ante LPS 24h.

Para conocer el grado de activación microglial, dado que en experimentos anteriores se comprobó que la cantidad de proteína obtenida por cada cultivo era escasa para técnicas de inmunoblot, se recurrió de nuevo a una medida cuantitativa mediante RT-qPCR, midiendo en este caso, además de $Il-1\beta$, el factor necrótico tumoral ($TNF\alpha$), una citoquina proinflamatoria de respuesta temprana al estrés.

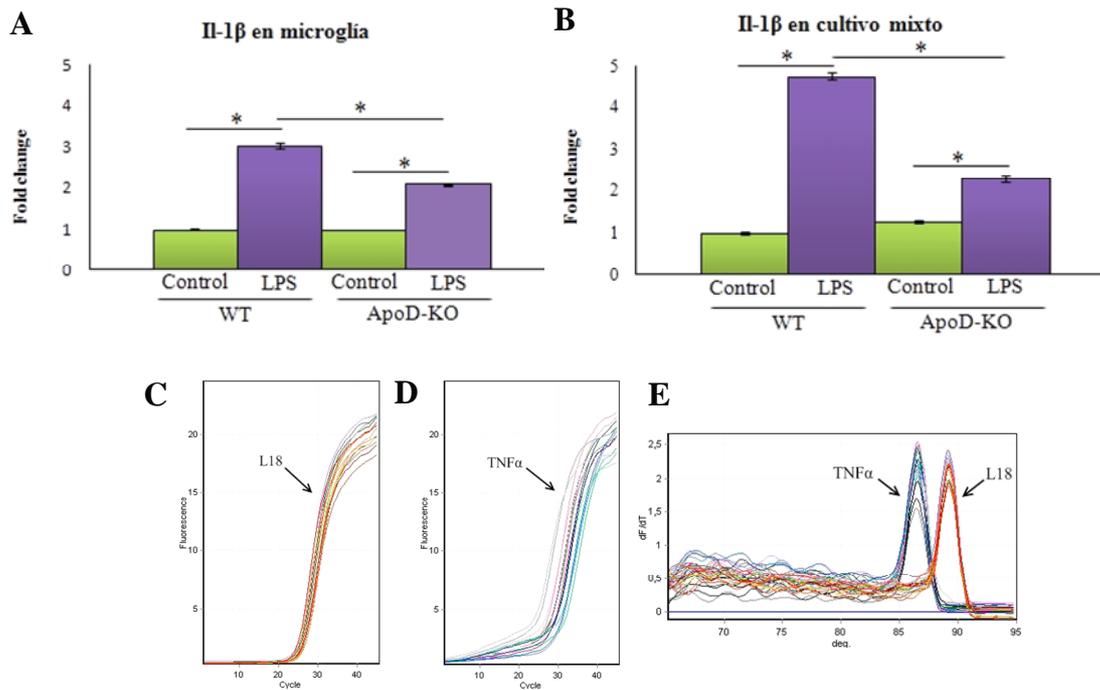


Figura 17. Expresión de IL-1β y TNFα en cultivos WT y ApoD-KO en condiciones control y tras tratamiento con LPS 24h. A) Expresión de IL-1β en cultivos enriquecidos en microglía. B) Expresión de IL-1β en cultivos mixtos. C) Expresión de TNFα en cultivos enriquecidos en microglía. D) Expresión de L18 en cultivos enriquecidos en microglía. E) Curva de desnaturalización de TNFα y L18.

El patrón de activación de IL-1β en cultivos enriquecidos en microglía (Fig. 17A) y en cultivos mixtos (Fig. 17B) es el mismo en ambos casos, mostrándose un incremento de expresión ante el estímulo de LPS durante 24 horas. En el caso de TNFα se observó un incremento gradual en la fluorescencia en los primeros ciclos de la qPCR (Fig. 17C), mientras que la amplificación de L18, que genera la curva de referencia, este efecto no se produce (Fig. 17D). Se podría deducir que hay algún tipo de contaminación de DNA bicatenario, pero la curva de desnaturalización muestra una perfecta especificidad del producto como se muestra en la figura 17E. Estos efectos obtenidos en la RT-qPCR de TNFα hacen pensar en un problema con los cebadores, por lo que se está planteando el diseño de unos nuevos.

Finalmente, se analizó también mediante RT-qPCR la expresión de ApoD en cultivos mixtos expuestos a LPS 24h, observando una disminución en su expresión en el cultivo expuesto al estímulo proinflamatorio durante 24 horas.

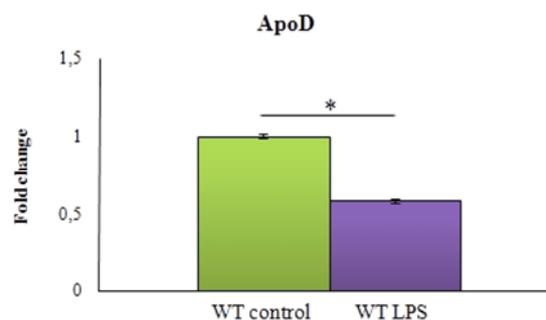


Figura 18. Expresión de ApoD en cultivos mixtos WT en condiciones control y tras tratamiento con LPS 24h.

5. Discusión y perspectivas

El primer objetivo de este trabajo fue caracterizar los cultivos gliales primarios enriquecidos en microglía como primer paso para un posterior desarrollo de experimentos a fin de conocer más sobre el mecanismo de acción de ApoD sobre la microglía.

Caracterización de los cultivos enriquecidos en microglía

La escasa densidad de microglía obtenida en los cultivos ha dificultado bastante el estudio. Con las primeras inmunocitoquímicas dobles con fluorescencia se consiguió conocer que los anticuerpos primarios funcionaban correctamente. Sin embargo, debido a una elevada autofluorescencia basal fue imposible realizar un conteo de tipos celulares como estaba inicialmente diseñado. Sabiendo que los anticuerpos primarios funcionaban correctamente, la siguiente prueba fue realizar inmunocitoquímicas con un revelado con peroxidasa de rábano y con cada marcador por separado.

Al ser cultivos enriquecidos en microglía, se dirigió la primera inmunocitoquímica contra GFAP, una proteína del citoesqueleto de astrocitos, puesto que debería ser una población muy poco representativa en los cultivos. Efectivamente, el número de células marcadas (astrocitos) era más bajo que el de células no marcadas (microglía) como se puede ver en la figura 8A, pero realmente, el marcaje no era fiable del todo puesto que GFAP se expresa fundamentalmente cuando los astrocitos están activados (Middeldorp and Hol 2011). Tres marcadores microgliales fueron probados por inmunocitoquímica, Galectina 3, Cd11b y F4/80 y dieron buenos resultados. Sin embargo, la poca densidad celular no hacía esta técnica la más adecuada para medir cuantitativamente la proporción de células marcadas. Aún así, sirvió para conocer el patrón de marcaje, observando claramente en la figura 9C que Galectina 3 es expresada por células activadas ameboides y no por las células ramificadas en reposo, mientras que Cd11b y F4/80 se expresan en ambos estados fisiológicos de la microglía.

Por otro lado, al caracterizar el cultivo utilizando inmunoblot, no se detectaron ApoD ni Cd11b, posiblemente debido a la baja densidad celular y a la baja expresión de estos genes en estas condiciones de cultivo. En el caso de la detección de iNOS el anticuerpo reconoce una banda en los cultivos mixtos cuyo peso molecular no coincide con el esperado (datos no mostrados). En el futuro planteo realizar experimentos con microglía activada para sacar conclusiones sobre dicho resultado. El patrón de expresión de Galectina 3 concuerda con los resultados de inmunocitoquímica, puesto que su expresión está aumentada más de 3 veces en los cultivos mixtos respecto a los enriquecidos en microglía. Esto apoya la interacción existente entre microglía y astroglía. Cuando ambas células están presentes en el cultivo intercambian señales de activación como se propuso en la figura 4.

Finalmente, usé una cuantificación mediante RT-qPCR de la expresión del gen *Emr1* (que produce la proteína F4/80), para conocer el enriquecimiento de mis cultivos de microglía usando como referencia los cultivos mixtos. El resultado fue que los cultivos microgliales estaban 9 veces más enriquecidos en microglía que los cultivos mixtos. Esta cuantificación es relativa, por lo que para obtener una cuantificación neta del porcentaje de enriquecimiento del cultivo he realizado el diseño de cebadores para el gen *Aldh1L1*, un gen descrito recientemente como un nuevo marcador específico de astrocitos e independiente de su estado de activación (Cahoy et al. 2008). Estos cebadores se usarán en experimentos de RT-qPCR para obtener información de

la cantidad de astrocitos que se encuentran en los cultivos enriquecidos en microglía, consiguiendo una cuantificación real y una caracterización definitiva.

Los datos de referencia en esta técnica sitúan en >98% la pureza en los cultivos de microglía (Saura et al. 2003), pero a falta de conseguir una cuantificación de mis cultivos, las medidas cualitativas realizadas parecen reflejar una pureza menor. Así, sería interesante plantear en el futuro el uso de otras técnicas de aislamiento de microglía, como puede ser la descrita por Moussaud (2010) o un nuevo método diseñado por MACS llamado gentleMACS™ Dissociator, que consigue separar microglía incluso de cerebro adulto mediante el uso de anticuerpos, conjugados a una partícula metálica, contra epítomos de membrana específicos de microglía. Se hace pasar a las células por un campo magnético y se consigue una separación celular muy eficiente, pudiendo ser una solución al problema de baja densidad en los cultivos de microglía.

Respuestas gliales a estímulos pro-oxidantes y proinflamatorios.

Los siguientes objetivos consistían en exponer mi cultivo a estímulos pro-oxidativos y proinflamatorios para estudiar el efecto que podría tener la astrogliá sobre la microglía, y si este efecto estaba mediado de algún modo por la presencia de ApoD.

- **Respuesta a la oxidación.**

Tras 24h de Paraquat (PQ), un herbicida generador de estrés oxidativo y ampliamente usado para este propósito, la primera diferencia que encontramos es su efecto directo sobre la microglía. Su morfología ramificada, característica de un estado de reposo, se observa en las condiciones control, pero en el cultivo expuesto a la situación experimental vemos cómo las células tienen una morfología ameboide, característica de su estado de activación (Fig. 12). Por otro lado, no se observa diferencia alguna entre los cultivos procedentes de ratones WT y los deficientes en ApoD, lo cual concordaría con la hipótesis de que la microglía no expresa ApoD.

La expresión de la proteína Galectina 3, analizada mediante inmunoblot, apoya los datos obtenidos en la caracterización del cultivo, aumentando su expresión cuando la microglía está en presencia de astrogliá. Así, su expresión no varía significativamente en los cultivos enriquecidos en microglía tras 24 horas de exposición a PQ respecto al control, pero sí lo hace en los cultivos mixtos, estando más expresada en la situación experimental. Estos datos concuerdan perfectamente con la hipótesis inicial de que el PQ afecta a los astrocitos, siendo éstos los encargados de señalar para una activación microglial (Bajo-Grañeras et al. 2011b; Klintworth et al. 2009).

La expresión de ApoD se analizó tanto mediante inmunoblot para conocer la cantidad de proteína expresada por los astrocitos, como a nivel de expresión de mRNA. Los resultados obtenidos en inmunoblot (Fig. 13A) muestran que, como se esperaba por resultados anteriores (Bajo-Grañeras et al. 2011b), tras un estímulo como son 24 horas de estrés oxidativo hay una activación y un aumento de ApoD, a fin de proteger ante el daño. Por otra parte mis resultados confirman que ApoD es un gen de respuesta temprana, puesto que a las 24 horas no aparece un incremento en la expresión de mRNA, sino una disminución, quizás debido a una retroalimentación negativa (Fig. 15). Algo similar encontramos al analizar una citoquina proinflamatoria como es Il-1 β , expresada por microglía (Amantea et al. 2010). En las condiciones experimentales antes descritas, tanto en cultivos de ratones WT como ApoD-KO, encontramos niveles de expresión por debajo de los basales. Probablemente, tras una activación inicial en las primeras horas de exposición al PQ se ha detenido su expresión, encontrándose

disminuida a las 24 horas debido a una retroalimentación negativa que dejará paso a otro tipo de genes de respuesta más tardía. Algo que habría que estudiar más en detalle es la activación basal que se encuentra en el cultivo mixto control de ratones ApoD-KO (Fig. 14), pudiendo entenderse como que la falta de ApoD activa de forma basal a la microglía, aunque estos datos no coinciden con los obtenidos en la misma situación en el experimento de estimulación inflamatoria (Fig. 17B).

Con estos datos obtenidos, se propone como respuesta a lo planteado en los objetivos específicos que el estímulo pro-oxidante activa a la microglía por mediación de los astrocitos, así como que esta respuesta está modulada por la presencia de ApoD.

- **Respuesta a la inflamación.**

Para estudiar la respuesta microglial a un estímulo proinflamatorio, se expusieron los cultivos durante 24 h a LPS, un estimulante inmunológico de amplio espectro que causa inflamación en muchos tipos celulares, entre ellos la microglía. En este caso, a diferencia del experimento con PQ, los cultivos se mantuvieron durante 6 horas tras la siembra antes de añadirles el estímulo para comprobar si realmente la morfología ameboide activada encontrada tras el tratamiento con PQ se debía realmente al estímulo o a que simplemente las células no habían tenido tiempo de recuperarse tras la tripsinización. Así, efectivamente, en este caso no se encontró ninguna diferencia morfológica ni entre los cultivos controles y experimentales ni entre los de ratones WT y ApoD-KO.

Sería conveniente repetir ambos experimentos con las condiciones contrarias, es decir, dejando un tiempo de recuperación a los cultivos antes de exponerlos a PQ, y no dejárselo a los expuestos a LPS, para determinar realmente si estas observaciones morfológicas son debidas al propio estímulo o a la falta de tiempo para recuperarse y poder responder al estímulo desde un estado ya de reposo. Aunque morfológicamente no se haya encontrado diferencia en los cultivos expuestos a LPS durante 24 horas, el análisis de la citoquina proinflamatoria Il-1 β , en cultivos tanto enriquecidos en microglía como mixtos, muestra un incremento en su expresión en los cultivos estimulados, siendo este incremento mayor en los cultivos mixtos (Fig. 17B) que en los enriquecidos en microglía (Fig. 17A). Igualmente, esta activación es mayor en los cultivos procedentes de ratones WT que en los deficientes en ApoD, aunque en estos últimos no se encuentra un incremento basal tan grande como el observado con el estimulador oxidativo.

Intenté estudiar la activación microglial atendiendo a la expresión de otra citoquina proinflamatoria, el TNF α , mediante RT-qPCR, pero como se observa en la figura 17D se obtuvieron resultados anómalos. Debo realizar más estudios sobre ello, puesto que el incremento gradual de fluorescencia observado en los primeros ciclos sin que haya ninguna inespecificidad como se observa en la curva de desnaturalización (Fig. 17E) puede ser debido a un diseño inadecuado de los cebadores. Por ello, voy a diseñar nuevos cebadores ya que TNF α es una citoquina bastante importante en la activación microglial como para no analizar su expresión.

En respuesta a lo propuesto en los objetivos específicos, con los datos obtenidos, sugiere una posible mediación de los astrocitos ante una respuesta inflamatoria así como por parte de ApoD.

Haciendo una comparativa de la respuesta de ApoD e Il-1 β en ambos experimentos, concluimos que, tras 24 horas de estímulo, la expresión de Il-1 β se mantiene elevada ante LPS

mientras que ante el estímulo oxidativo se encontraba ya en el momento de retroalimentación negativa. En el caso de ApoD, ante el estímulo con PQ se encuentra en niveles por debajo de los basales, mientras que está a nivel basal ante el estímulo proinflamatorio. Atendiendo a estos datos, reflejados en la figura 19, y sabiendo que la activación microglial depende de la potencia del estímulo (Amantea et al. 2010), mi hipótesis propone que el LPS podría ser un estímulo más potente o duradero que el PQ, prolongando la expresión en el tiempo de los genes de respuesta temprana como Il-1 β . En el caso de ApoD, expresado por astrocitos, se conoce esta curva de expresión por experimentos anteriores (Bajo-Grañeras et al. 2011b), pero no se conoce su activación directa ante LPS, inicialmente descrita como activador microglial.

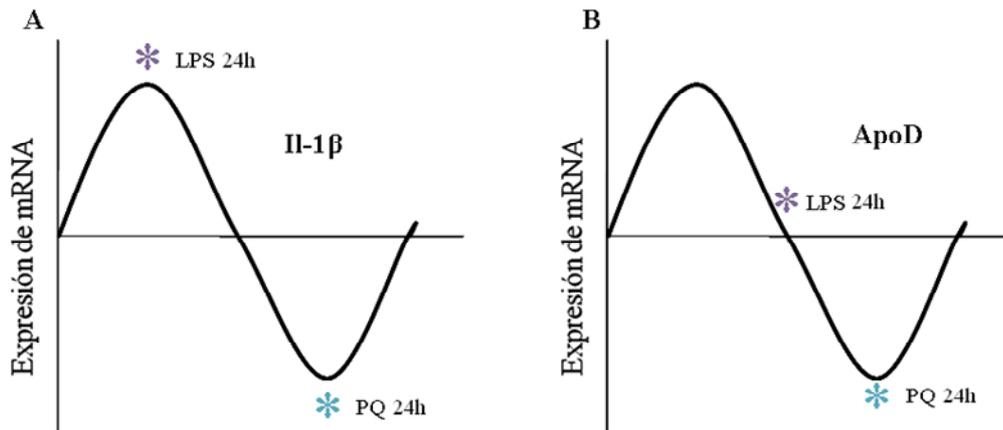


Figura 19. Momento de expresión de Il-1 β y ApoD a las 24 horas del tratamiento con LPS y PQ. A) Expresión de Il-1 β . B) Expresión de ApoD.

Para conocer en profundidad la respuesta ante ambos estímulos sería conveniente un estudio del curso temporal de la expresión de Il-1 β , TNF α y ApoD, para validar las hipótesis que propongo al analizar mis resultados.

6. Bibliografía

- Amantea D, Bagetta G, Tassorelli C, Mercuri NB, Corasaniti MT. 2010. Identification of distinct cellular pools of interleukin-1beta during the evolution of the neuroinflammatory response induced by transient middle cerebral artery occlusion in the brain of rat. *Brain Res* 1313:259-69.
- Armbrust E, Rohl C. 2008. Time- and activation-dependency of the protective effect of microglia on astrocytes exposed to peroxide-induced oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 22(5):1399-404.
- Ayrault-Jarrier M, Levy G, Polonovski J. 1963. Etude des Alpha-apolipoprotéines sériques humaines par immunoélectrophorèse. *Bull Soc Chim Biol* 45:703-713.
- Bajo-Grañeras R, Ganfornina MD, Martin-Tejedor E, Sanchez D. 2011b. Apolipoprotein D mediates autocrine protection of astrocytes and controls their reactivity level, contributing to the functional maintenance of paraquat-challenged dopaminergic systems. *Glia* 59(10):1551-66.
- Bajo-Grañeras R, Sanchez D, Gutierrez G, Gonzalez C, Do Carmo S, Rassart E, Ganfornina MD. 2011a. Apolipoprotein D alters the early transcriptional response to oxidative stress in the adult cerebellum. *J Neurochem* 117(6):949-60.
- Boyles JK, Notterpek LM, Anderson LJ. 1990. Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 265(29):17805-15.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA and others. 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28(1):264-78.
- Cofer S, Ross SR. 1996. The murine gene encoding apolipoprotein D exhibits a unique expression pattern as compared to other species. *Gene* 171(2):261-3.
- Del Río-Hortega P. 1932. Microglia. Cytology and cellular pathology of the nervous system. p 482-1924-534.
- Drayna D, Fielding C, McLean J, Baer B, Castro G, Chen E, Comstock L, Henzel W, Kohr W, Rhee L and others. 1986. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J Biol Chem* 261(35):16535-9.
- Eichinger A, Nasreen A, Kim HJ, Skerra A. 2007. Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *J Biol Chem* 282(42):31068-75.
- Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, Gonzalez C, Bastiani MJ, Rassart E, Sanchez D. 2008. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell* 7(4):506-15.
- Ganfornina MD, Do Carmo S, Martinez E, Tolivia J, Navarro A, Rassart E, Sanchez D. 2010. ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury. *Glia* 58(11):1320-34.
- Ganfornina MD, Sanchez D, Bastiani MJ. 1995. Lazarillo, a new GPI-linked surface lipocalin, is restricted to a subset of neurons in the grasshopper embryo. *Development* 121(1):123-34.
- Ganfornina MD, Sanchez D, Greene LH, Flower DR. 2006. The lipocalin protein family: Protein sequence, structure and relationship to the calycin superfamily. *Lipocalins*. p 17-27.
- Ganfornina MD, Sanchez D, Pagano A, Tonachini L, Descalzi-Cancedda F, Martinez S. 2005. Molecular characterization and developmental expression pattern of the chicken apolipoprotein D gene: implications for the evolution of vertebrate lipocalins. *Dev Dyn* 232(1):191-9.
- Hull-Thompson J, Muffat J, Sanchez D, Walker DW, Benzer S, Ganfornina MD, Jasper H. 2009. Control of metabolic homeostasis by stress signaling is mediated by the lipocalin NLaz. *PLoS Genet* 5(4):e1000460.

- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91(2):461-553.
- Klintworth H, Garden G, Xia Z. 2009. Rotenone and paraquat do not directly activate microglia or induce inflammatory cytokine release. *Neurosci Lett* 462(1):1-5.
- Lambert J, Provost PR, Marcel YL, Rassart E. 1993. Structure of the human apolipoprotein D gene promoter region. *Biochim Biophys Acta* 1172(1-2):190-2.
- Levros LC, Jr., Do Carmo S, Edouard E, Legault P, Charfi C, Rassart E. 2010. Characterization of nuclear factors modulating the apolipoprotein D promoter during growth arrest: implication of PARP-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities. *Biochim Biophys Acta* 1803(9):1062-71.
- Loerch PM, Lu T, Dakin KA, Vann JM, Isaacs A, Geula C, Wang J, Pan Y, Gabuzda DH, Li C and others. 2008. Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. *PLoS One* 3(10):e3329.
- Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41(4):535-47.
- McConathy WJ, Alaupovic P. 1973. Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett* 37(2):178-82.
- Middeldorp J, Hol EM. 2011. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93(3):421-43.
- Moussaud S, Draheim HJ. 2010. A new method to isolate microglia from adult mice and culture them for an extended period of time. *J Neurosci Methods* 187(2):243-53.
- Navarro A, del Valle E, Juarez A, Martinez E, Ordonez C, Astudillo A, Tolivia J. 2010. Apolipoprotein D synthesis progressively increases in frontal cortex during human lifespan. *Age (Dordr)* 32(1):85-96.
- Navarro A, Del Valle E, Tolivia J. 2004. Differential expression of apolipoprotein d in human astroglial and oligodendroglial cells. *J Histochem Cytochem* 52(8):1031-6.
- Navarro A, Tolivia J, Astudillo A, del Valle E. 1998. Pattern of apolipoprotein D immunoreactivity in human brain. *Neurosci Lett* 254(1):17-20.
- Ordoñez C, Navarro A, Perez C, Astudillo A, Martinez E, Tolivia J. 2006. Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease. *Histol Histopathol* 21(4):361-6.
- Provost PR, Weech PK, Tremblay NM, Marcel YL, Rassart E. 1990. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D. *J Lipid Res* 31(11):2057-65.
- Rassart E, Bedirian A, Do Carmo S, Guinard O, Sirois J, Terrisse L, Milne R. 2000. Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta* 1482(1-2):185-98.
- Reindl M, Knipping G, Wicher I, Dilitz E, Egg R, Deisenhammer F, Berger T. 2001. Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 119(2):327-32.
- Röhl C, Armbrust E, Herbst E, Jess A, Gulden M, Maser E, Rimbach G, Bosch-Saadatmandi C. 2010. Mechanisms involved in the modulation of astroglial resistance to oxidative stress induced by activated microglia: antioxidative systems, peroxide elimination, radical generation, lipid peroxidation. *Neurotox Res* 17(4):317-31.
- Röhl C, Armbrust E, Kolbe K, Lucius R, Maser E, Venz S, Gulden M. 2008. Activated microglia modulate astroglial enzymes involved in oxidative and inflammatory stress and increase the resistance of astrocytes to oxidative stress in vitro. *Glia* 56(10):1114-26.
- Rotshenker S, Reichert F, Gitik M, Haklai R, Elad-Sfadia G, Kloog Y. 2008. Galectin-3/MAC-2, Ras and PI3K activate complement receptor-3 and scavenger receptor-AI/II mediated myelin phagocytosis in microglia. *Glia* 56(15):1607-13.
- Roumier A, Bechade C, Poncer JC, Smalla KH, Tomasello E, Vivier E, Gundelfinger ED, Triller A, Bessis A. 2004. Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J Neurosci* 24(50):11421-8.
- Saha RN, Pahan K. 2006. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* 8(5-6):929-47.

- Sanchez D, Ganfornina MD, Bastiani MJ. 1995. Developmental expression of the lipocalin Lazarillo and its role in axonal pathfinding in the grasshopper embryo. *Development* 121(1):135-47.
- Sanchez D, Ganfornina MD, Gutierrez G, Jauneau A-C, Risler J-L, Salier J-P. 2006a. Lipocalin genes and their evolutionary history. *Lipocalins*. p 5-12.
- Sanchez D, Ganfornina MD, Martinez S. 2002. Expression pattern of the lipocalin apolipoprotein D during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 110(1-2):225-9.
- Sanchez D, Ganfornina MD, Torres-Schumann S, Speese SD, Lora JM, Bastiani MJ. 2000. Characterization of two novel lipocalins expressed in the *Drosophila* embryonic nervous system. *Int J Dev Biol* 44(4):349-59.
- Saura J, Tusell JM, Serratosa J. 2003. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44(3):183-9.
- Seguin D, Desforages M, Rassart E. 1995. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Brain Res Mol Brain Res* 30(2):242-50.
- Smith KM, Lawn RM, Wilcox JN. 1990. Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization. *J Lipid Res* 31(6):995-1004.
- Spreyer P, Schaal H, Kuhn G, Rothe T, Unterbeck A, Olek K, Muller HW. 1990. Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO J* 9(8):2479-84.
- Streit WJ. 2000. Microglial response to brain injury: a brief synopsis. *Toxicol Pathol* 28(1):28-30.
- Streit WJ, Xue QS. 2009. Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 4(4):371-9.
- Suresh S, Yan Z, Patel RC, Patel YC, Patel SC. 1998. Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *J Neurochem* 70(1):242-51.
- Terrisse L, Poirier J, Bertrand P, Merched A, Visvikis S, Siest G, Milne R, Rassart E. 1998. Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem* 71(4):1643-50.
- Thomas EA, Dean B, Pavey G, Sutcliffe JG. 2001. Increased CNS levels of apolipoprotein D in schizophrenic and bipolar subjects: implications for the pathophysiology of psychiatric disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7):4066-71.
- Thomas EA, Laws SM, Sutcliffe JG, Harper C, Dean B, McClean C, Masters C, Lautenschlager N, Gandy SE, Martins RN. 2003. Apolipoprotein D levels are elevated in prefrontal cortex of subjects with Alzheimer's disease: no relation to apolipoprotein E expression or genotype. *Biol Psychiatry* 54(2):136-41.
- van den Berg TK, Kraal G. 2005. A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. *Trends Immunol* 26(10):506-9.
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. 2009. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29(13):3974-80.
- Weinstein JR, Swarts S, Bishop C, Hanisch UK, Moller T. 2008. Lipopolysaccharide is a frequent and significant contaminant in microglia-activating factors. *Glia* 56(1):16-26.